



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**AISLAMIENTO DE CHLAMYDIA PSITTACI
EN AVES DE ORNATO MEDIANTE CULTIVO
CELULAR Y LA PRUEBA DE
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.**

T E S I S

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

POR:

ANA MARIA ROJAS MARTINEZ

ASESORES:

**M. SC. MVZ. CRISTINA ESCALANTE OCHOA
MVZ. JOSE LUIS SOLORIZANO VELASCO**

MEXICO, D. F.

1996.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

D E D I C A T O R I A

- A mis padres, por toda su confianza y paciencia,
- a mis hermanos porque sin su ayuda incondicional no lo hubiera logrado,
- a mis abuelos y tías por todo su respaldo
- y a mis amigas por estar siempre conmigo.

A G R A D E C I M I E N T O S

A agradezco a todas las personas que se vieron involucradas en este trabajo:

A mis asesores Cristina Escalante, por no dejarme desistir y apoyarme incondicionalmente; y al MVZ. José Luis Solórzano por prestarme sus aves para la realización de esta tesis.

A mi jurado por involucrarse tanto con este trabajo y por hacerme ver mis errores.

A mis compañeros y amigos Rubén y Cuauhtémoc por su ayuda, comprensión y amistad.

A todas las personas especiales que me han rodeado, compartiendo momentos agradables y a Antonio por aguantar con mucho coraje todas mis locuras.

C O N T E N I D O

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	11
RESULTADOS	16
LITERATURA CITADA	22
DIAGRAMA DE FLUJO	28, 31
FIGURAS	27,29,30,32,33,34
CUADROS	31,32

RESUMEN

ROJAS MARTINEZ, ANA MA. AISLAMIENTO DE *Chlamydia psittaci* EN AVES DE ORNATO MEDIANTE CULTIVO CELULAR Y LA PRUEBA DE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA (Bajo la dirección de: MVZ. M. Sc. Cristina Escalante Ochoa y MVZ. José Luis Solórzano Velasco).

Con el fin de determinar la presencia de *Chlamydia psittaci* en aves de ornato, clínicamente sanas en nuestro país, fueron muestreadas 40 aves de los géneros *Amazona*, *Agapornis*, *Ara*, *Pionus* y *Ramphastos*, 20 de ellas mantenidas en condiciones de cautiverio y 20 en semicautiverio. Las muestras cloacales y conjuntivales fueron inoculadas en monoestratos celulares de fibroblastos de ratón L-929 con medio COON'S F-12 suplementado y adicionado con polietilenglicol al 7%, e incubadas durante 6 días a 37°C, en atmósfera húmeda con 6% de CO₂. Las inclusiones clamidiales citoplasmáticas características se identificaron mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, utilizando sueros policlonales específicos, al realizar una coloración con anticuerpos marcados con isothiocianato de fluoresceína dirigidos contra el LPS clamidiano, ya que ésta técnica inmunohistoquímica realizada a partir de cultivos celulares es muy sensible, asegurando una especificidad alta en el diagnóstico de la clamidiosis. Paralelamente se analizaron las muestras mediante procedimientos de bacteriología general a fin de observar la relación existente entre *Chlamydiae* y otros microorganismos bacterianos mesófilos aerobios concomitantes. El 100% de las muestras de ambos grupos fue positivo al aislamiento de *Chlamydia psittaci* mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta. Los microorganismos de los géneros *Corynebacterium*, *Erysipelothrix*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Kurthia*, *Staphylococcus*, *Actinomyces* y *Escherichia* se aislaron en porcentajes de del 5 al 25 % a partir de las muestras cloacales. De las

muestras conjuntivales en porcentajes de 5 al 20% las bacterias pertenecientes a los géneros *Klebsiella*, *Neisseria* y *Staphylococcus*; no se observaron diferencias entre ambos grupos de aves ni relación aparente entre *Chlamydia psittaci* y las otras bacterias aisladas.

I. INTRODUCCIÓN

En 1893, en París se informó la transmisión de un agente infeccioso de los pericos a los humanos, mismo que causaba un cuadro clínico signos de influenza, al cual Morange, en 1895 denominó como psitacosis (del latín *psittacus* = loro). Al principio se pensó que la psitacosis aviar ocurría solamente en aves psitácidas, sin embargo, en 1932 Meyer y Eddie, reportaron un caso de psitacosis en humanos infectados a partir de pollos enfermos. En 1938, Haagen y Mauer aislaron al agente en un petrel (ave marina). En 1940 Pinkerton y Swank lo encontraron en pichones domésticos infectados. Wollins en 1948, reportó varios casos en patos domésticos. A partir de entonces se nombró a esta enfermedad ornitosis. Actualmente, el término que se utiliza es el de "clamidiosis" que deriva de la palabra griega *chlamys* que significa ocultar (3,17,39). La clamidiosis es una infección expandida en todo el mundo afectando a los animales domésticos y silvestres, y que a través del tiempo se ha caracterizado por tener una alta frecuencia en infecciones subclínicas (5,31,37).

I.1 ETIOLOGÍA

El orden *Chlamydiales* contiene a la familia *Chlamydiaceae* y ésta al género *Chlamydia*, con las siguientes especies *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* y *C. pecorum* (2,10,19,39).

C. psittaci es un microorganismo procariote intracelular obligado, considerado como un parásito de energía, posee una envoltura similar a las bacterias Gram negativas, ésta envoltura posee al lipolisacárido (LPS), el cual contiene al trisacárido 3 deoxy-D- mano-2-ácido octulosónico (Kdo) de la secuencia Kdo (2-8- α Kdo (2-4), ésta estructura representa un epitopo específico del género *Chlamydiae*, se divide por fisión binaria dentro de un ciclo único de desarrollo, por la formación de inclusiones intracitoplasmáticas características y remarcando con ello su capacidad de esquivar las defensas inmunes de la célula huésped (1).

La morfología de la bacteria varía según su curso dentro del ciclo de desarrollo y se presenta de dos formas: A) el cuerpo elemental (CE): partícula electrodensa esférica aproximadamente de 0.2 a 0.3 μ m de diámetro que representa la forma infecciosa del microorganismo, extracelular responsable de la adherencia y la promoción de su entrada a la célula epitelial. B) el cuerpo reticular (CR) partícula que mide aproximadamente 0.6 a 2 μ m, osmóticamente frágil, que representa la forma intracelular metabólicamente activa y a cargo de la multiplicación de la bacteria; así el CR sintetiza su propio ADN, ARN y proteínas, pero algunas de sus propiedades son limitadas pues no puede completar la vía de las pentosas, y no utilizan el piruvato en la ruta del ciclo de Krebs. Sin embargo sí pueden catabolizar el ácido pirúvico, el ácido aspártico y el ácido glutámico (32,42).

1.2 CEPAS DE *Chlamydia psittaci*

Chlamydia psittaci se ha aislado de un gran número de aves y mamíferos, incluyendo al hombre, y también en una especie de rana africana (*Xenopus laevis*) (6,26,32,40).

Las cepas aviares están contenidas en un solo biovar, que incluye a 6 serovares (A a F) presentan una gran diversidad en patogenicidad y virulencia, ya que éstas varían según el

ave que la hospede, e incluso algunas cepas apatógenas pueden causar daño a otras especies de animales (39).

1.3 CICLO DE DESARROLLO

El ciclo característico de multiplicación *Chlamydiae* consiste esencialmente de 5 fases:

1) Adherencia.- El CE presenta un tropismo preferencial por la membrana las células del epitelio cilíndrico, esencialmente células de la mucosa respiratoria y digestiva de las aves, así como los macrófagos. Se ha sugerido que la célula hospedadora posee receptores para esta bacteria.

2) Penetración.- El CE induce su propia ingestión mediante una invaginación de la membrana externa de la célula huésped penetrando al interior de la misma en una vacuola (endocitosis) y evitando la fusión fagolisosomal a través de mecanismos no completamente dilucidados a la fecha.

3) Transición de Cuerpo Elemental hacia Cuerpo Reticular.- La reorganización del CE metabólicamente inerte al CR metabólicamente activo, consiste en una modificación a nivel de la membrana de CE, los puentes disulfuros interproteicos desaparecen, se realiza una síntesis de ADN, ARN y proteínas transformándolo en CR.

4) Multiplicación bacteriana.- El CR inicia un proceso repetitivo de fisión binaria, incrementándose así la población clamidial y en consecuencia ocasionando que la inclusión aumente de tamaño.

5) Transición de Cuerpos Reticulares a Cuerpos Elementales.- La maduración del CR se lleva a acabo dentro de la inclusión hasta que se convierte en CE infectante. Este es un proceso inverso al mencionado en el inciso 3) en ambos casos se desconocen el o los factores que determinan estas interconversiones.

6) Liberación de los Cuerpos Elementales.- La célula huésped se lisa por la liberación de enzimas de *Chlamydiae* dando lugar a la liberación de cientos de CE cada uno de los cuales es capaz de infectar a una nueva célula. (9,25,33,37,39,41,42) (Figura No. 1).

En el caso de las cepas clamidiales que afectan a las aves, el ciclo de desarrollo tiene una duración de promedio de 36 a 50 horas (38).

1.4 EPIZOOTIOLOGIA

Al menos 159 especies aviares son actualmente reconocidos como hospedadoras de *Chlamydia psittaci*, y éstas generalmente la albergan en forma subclínica. Se ha visto que los psitácidos como son los loros y pericos entre otros, y los colubiformes, entre los que se encuentran palomas, pichones y tórtolas; son relativamente menos resistentes a la infección, representando los grupos reservorios naturales más importantes, correspondiendo el 25% de las especies hospedadoras a especies psitaciformes. En la actualidad, la tasa de prevalencia que ha sido diagnosticada en varias áreas de los Estados Unidos de Norte América va desde un 15 a 30% reportada para aves psitaciformes, mientras que para aves columbiformes es de 30 a 80% (4,21,23,24,30,40,41,44). Los passeriformes como canarios, pinzón, cardenal, entre otros; son sensibles. Los faisanes, pollos, pavos y gallinas de Guinea que pertenecen a las gallináceas, son las principales fuentes de infección para los humanos en Estados Unidos de Norte América; siendo los pollos relativamente más resistentes a las infecciones clamidiales en comparación con los pavos. También se ha identificado en los palmípedos, en petreles, avestruces, aves rapaces y carroñeras (3,4,6,18,33,43).

La transmisión de *Chlamydia psittaci* entre las aves, así como la manifestación clínica de la clamidiosis se relaciona con la virulencia del microorganismo, susceptibilidad del huésped, cambios en su microclima, y factores de tensión como mala nutrición,

sobrepoblación, transporte, migración, parásitos (ascaridiosis, giardiosis), periodo de reproducción (3, 4,5,13,31,45).

La ingestión e inhalación de aerosoles y excretas infectadas son las rutas más importantes de transmisión en la naturaleza; los recién nacidos pueden infectarse con exudados o excretas infecciosas de los padres, siendo la alimentación por regurgitación determinante en la exposición y transmisión; la transmisión por artrópodos también se ha sugerido. La transmisión vertical ha sido demostrada en los patos (4,6).

Considerando únicamente a las aves que se han informado infectadas en vida libre, el 22 % corresponde a las aves paseriformes (aves de percha), un 23 % en caradriformes (aves de costa, gaviotas, golondrina de mar, etc.) seguida de un 16 % de aves anseriformes (aves acuáticas); el restante 39 % incluye 11 órdenes y 43 especies de diferentes variedades de aves, de nichos ecológicos y de zonas geográficas (4).

1.5 CUADRO CLÍNICO Y PATOLÓGICO

Presentación sobreaguda: se observa particularmente en aves jóvenes y aves de talla pequeña, la muerte es súbita sin signos aparentes.

Presentación aguda: se observa particularmente en los géneros *Amazona* y *Ara*. La enfermedad se presenta en forma sistémica, el animal se encuentra abatido, acurrucado, con alas caídas, con un aspecto de adormecimiento y con estremecimiento, hipertermia, párpados semicerrados, blefaroconjuntivitis, e incluso puede haber queratoconjuntivitis. También presenta problemas respiratorios como disnea, polipnea, descarga nasal seromucosa, estornudos; y problemas digestivos como gastroenteritis, dando lugar a diarrea amarilla, verdosa o café, y plumas pericloacales sucias. Existe poliuria, la orina frecuentemente es de color amarillento o verdoso por la presencia de bileverdina. Las hembras generalmente dejan de poner, y si la postura continúa se incrementa la

mortalidad embrionaria. Así mismo existe afección del sistema nervioso central, con manifestaciones de parálisis y convulsiones, mismos que preceden a la muerte, la cual generalmente ocurre de 4 a 15 días después que la bacteria ha infectado a las células del ave.

Presentación crónica: los signos que se observan son esencialmente respiratorios: disnea, tos, estertores, estornudos y descarga nasal, acompañados de descarga ocular. Después sobreviene una recuperación aparente. En los pichones este tipo de cuadro clínico generalmente es el curso normal de la clamidiosis, se han observado torticolis, epistótonos, temblor y convulsiones.

Presentación subclínica o inaparente: en la mayoría de los casos son portadores asintomáticos. Para los psitácidos que viven en hogares particulares, la tasa de portadores crónicos asintomáticos se ha estimado en un 10 a 40 %, e incluso hasta en un 100%; la prevalencia se ha basado en el aislamiento de *Chlamydia psittaci* de aves muertas (mascotas) varía de un 20 a 50 % y por las diferencias de métodos de diagnóstico que se han utilizado (3, 45).

Las lesiones por clamidiosis que se observan a la necropsia son básicamente similares en la mayoría de especies de aves. Se presenta serositis con exudado fibrinoso denso amarillento en órganos y tejidos de la cavidad torácica y peritoneal, hepatomegalia, esplenomegalia, pericarditis y neumonía. Particularmente en los psitácidos existe esplenomegalia, hepatomegalia, enteritis, aerোসaculitis serofibrinosa o fibrinosa densa, pericarditis y conjuntivitis (3,6,23,36,39).

Histológicamente las lesiones son mínimas dependiendo de la virulencia de la cepa, de la susceptibilidad del huésped y de la ruta de infección. En los órganos y tejidos de la cavidad torácica y peritoneal se ha observado gran número de macrófagos, linfocitos y

heterófilos. En el aparato respiratorio existe consolidación pulmonar, resultado de una infiltración de macrófagos, edema, congestión y hemorragias. El hígado de las aves infectadas presenta necrosis multifocal con infiltración de heterófilos, macrófagos, monocitos y células plasmáticas, proliferación e hiperplasia de las células de Kupffer que rodean hemosiderina. La depleción del tejido linfóide, proliferación de las células del sistema retículo endotelial y macrófagos (histiocitosis) se han encontrado en el bazo. Finalmente el daño vascular puede explicarse por el exudado serofibrinoso que se encuentra en la superficie de los órganos y en los sacos aéreos, aunque cabe mencionar que en infecciones crónicas, la aeroculitis puede ser fibrinosa o granulomatosa. (6,13,23,24,25,36,41).

1.6 DIAGNOSTICO

El diagnóstico en animales vivos se realiza a través de la historia clínica, exámenes complementarios como las radiografías con medios de contraste, donde se llega a observar un aumento en la densidad de los sacos aéreos, hepatomegalia, esplenomegalia, desplazamiento de las vísceras abdominales y una disminución en el espacio visible de los sacos aéreos. Las pruebas hematológicas muestran una leucocitosis marcada (un aumento de 2 a 3 veces del rango normal), principalmente en los géneros Amazonas y Aras, al igual que heterofilia y anemia. La bioquímica sanguínea muestra un aumento en proteínas totales, deshidrogenasa láctica (LDH), transaminasa glutámica oxalacética (TGO), fosfatasa alcalina (CPK), globulinas y ácidos biliares (3).

Los criterios que se utilizan para el diagnóstico definitivo de la clamidiosis en aves requiere de la inoculación de embriones de pollo, animales de laboratorio o de cultivo celular para el aislamiento del microorganismo, la observación de lesiones macroscópicas características a la necropsia y con la demostración del microorganismo en los tejidos por

medio de tinciones histológicas como Giménez, Giemsa, Maquiavello entre otras (15,16,19,23,24,35,40,45), o por métodos de inmunofluorescencia que emplean anticuerpos policlonales contra *Chlamydia psittaci*. (3,12,32,34,41).

El diagnóstico diferencial se realiza con enfermedades como Pasterelosis, Salmonelosis, Colibacilosis, Micoplasmosis, Influenza Aviar y Enfermedad Respiratoria Crónica (3,6,13).

1.7 PREVENCIÓN

La prevención de la enfermedad en los psitácidos requiere de un tiempo de cuarentena de 30 días en los que se debe dar un tratamiento profiláctico con tetraciclinas y una vez que se le entrega al dueño éste debe continuarlo por 15 días. A la fecha no existen vacunas comerciales disponibles (24,29,43).

1.8 TRATAMIENTO

El tratamiento en aves incluye, tratamiento de sostén, terapia de fluidos, una dieta suplementada con lactulosa, vitaminas y administración de antibióticos como las tetraciclinas, de efecto bacteriostáticos, en cuyo caso, se debe tener cuidado porque pueden causar necrosis cuando se aplican por vía intramuscular. Algunos psitácidos son muy sensibles a estos antibióticos como en los géneros *Ara hyacynthe*, *Ara ararauna*, *Agapornis* sp. y *Cacatua* sp., en los que se ha observado regurgitación y mayor decaimiento del ave, para evitar estas complicaciones, se debe reducir la dosis. Otro quimioterapéutico que se ha utilizado son las quinolonas, como la enrofloxacin y ciprofloxacina; éstas producen un efecto bactericida, su dosis es menor y reduce el tiempo de tratamiento. Las dosis varían de acuerdo a la especie, edad y estado general del ave (3,19,30,39,43).

1.9 CLAMIDIOSIS EN HUMANOS CAUSADAS POR *Chlamydia psittaci*

Los humanos son infectados por inhalación de excretas secas, descarga lagrimal y nasal de aves contaminadas, en las cuales el agente puede sobrevivir. El período de incubación es de 5 a 14 días y la presentación clínica de la psitacosis humana puede variar considerablemente, desde una infección inaparente, un ligero resfriado, una neumonía atípica, hasta una enfermedad sistémica; siendo caracterizados por fiebre, dolores musculares, escalofrío y dolores de cabeza. De igual forma la enfermedad puede iniciar como un ligero resfriado o comenzar abruptamente con fiebres altas, escalofríos, dolores de cabeza, anorexia y con tos generalmente prominente (6,11,19,20,31,33).

El diagnóstico se realiza por medio de los signos clínicos; radiografías torácicas, en las que generalmente se observa una infiltración en ambos lóbulos pulmonares y pruebas serológicas. Las personas en riesgo incluyen criadores, vendedores y cuidadores de aves para mascotas, así como trabajadores de plantas de procesamientos de aves, y veterinarios (11,21,22,37,45).

La clamidiosis en humanos puede confundirse con fiebre Q, tularemia y neumonías bacterianas, el tratamiento de la enfermedad se realiza con tetraciclinas 500 mg cada 4 horas vía oral, durante 7 a 10 días (43).

En México se desconoce la presencia de *C. psittaci* en las aves, por consiguiente no se le ha diagnosticado, además en ocasiones puede estar enmascarada por otros microorganismos lo que la puede confundir con cualquier otra enfermedad. Debido a esto la información con la que contamos en el país es insuficiente.

III. OBJETIVOS GENERALES

1. Aislar a *Chlamydia psittaci* a partir de muestras cloacales y conjuntivales en cultivo celular L-929, de aves clínicamente sanas mantenidas en cautiverio y semicautiverio para su identificación posterior con la técnica de inmunofluorescencia indirecta.
2. Procesar muestras paralelas para caracterizar otras bacterias mesófilas aerobias que se encuentre poblando la mucosa cloacal y conjuntival de las aves de ornato con las técnicas de rutina del laboratorio del Depto. de Bacteriología y Micología de la FMVZ.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se colectaron 2 muestras por individuo a partir de cloaca y conjuntiva utilizando hisopos estériles, tomadas de 40 aves clasificadas en 2 grupos. El primer grupo abarcó 20 aves que han sido criadas en cautiverio en casas particulares, mientras que el segundo grupo comprendió 20 aves que viven en semicautiverio en los parques recreativos Atlantis, Reino Aventura y Acuario Aragón ubicados en México D. F. Las aves pertenecen a los siguientes géneros: *Amazonas autumnalis*, *A. ochrocephala*, *A. aestiva*, *A. albifrons*, *A. festiva* (loros); *Ara ararauna*, *A. macao* (Guacamayas), *Aratinga* sp. (periquitos verdes); *Agapomis* sp. ("periquitos del amor" o inseparables); *Melopsittacus* sp. (periquitos australianos); *Rhaphastos sulphuratus* (tucanes).

Para la detección de *Chlamydia psittaci* las muestras se colocaron en 2 ml de medio de transporte SPG (Sucrosa¹, Fosfato¹ y Glutamina¹), adicionado con 10% de suero fetal bovino², 100 mg/ml de estreptomina¹, 100 mg/ml de kanamicina¹, 50 mg/ml de

¹Sigma Chemical Co. ST. Louis MO. 63178. USA.

²In Vitro, S.A. México.

vancomicina¹ y 50 mg/ml nistatina¹. Para el estudio bacteriológico de mesófilos aerobios se transportaron en medio de Stuart³.

Todas las muestras fueron transportadas al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM para su análisis.

IV. 2 AISLAMIENTO DE *Chlamydia psittaci*

2.1 PREPARACIÓN DEL INOCULO

Las muestras en SPG se colocaron en el agitador orbital⁴ durante 1 hora, después se homogeneizaron por unos segundos en un vórtex⁵ y se centrifugaron durante 20 minutos a 800 x g, obteniéndose el antígeno de la muestra suspendido en el sobrenadante; finalmente, 1 ml de cada uno de los sobrenadantes se almacenó en tubos eppendorf⁶ a -70°C hasta su utilización. (Diagrama de flujo No. 1)

2.2 INFECCIÓN DE MONOESTRATOS

Para la realización del aislamiento en cultivo celular se utilizaron monoestratos celulares con la línea L-929² fibroblastos de ratón, se prepararon propagando los fibroblastos en botellas de poliestireno a una concentración de 1.1×10^5 cels/ml, utilizando medio RPMI² suplementado con 10 % de suero fetal bovino² 100 mg/ml de estreptomicina¹, 100 mg/ml de kanamicina¹, 50 mg/ml de vancomicina¹ y 50 mg/ml nistatina¹, 1 % aminoácidos no esenciales² y 1 % de L - glutamina¹. Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda hasta obtener el 100 % de confluencia celular.

¹ Sigma Chemical Co. St. Louis MO. 63178. USA.

² In Vitro, S.A. México.

³ Merck Darmstadt, R. F. Alemania. Merck de México.

⁴ Orbital shaker, Bellco Biotechnology, Vyneland, New Jersey. USA.

⁵ Super Mixer, Cat. No. 1290. Lab-line Instruments Inc. Melrose Park ill, USA.

⁶ NUNCLON DELTA. Inter Med, Nunc. Dinamark.

Después de este procedimiento, el medio fue reemplazado, las células se tripsinizaron⁷ y subcultivaron en microplacas de 24 pozos⁸ que contenían en su interior un cubreobjetos de 13 mm de diámetro a una concentración de 0.7×10^5 cels/ml utilizando medio COON'S F-12¹ suplementado con 10% suero fetal bovino², 100 mg/ml de estreptomicina¹, 100 mg/ml de kanamicina¹ 50 mg/ml de vancomicina¹ y 50 mg/ml nistatina, y 1 % aminoácidos no esenciales² y 1 % de L-glutamina¹. Las microplacas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda, hasta obtener un 60% de confluencia celular, esto aproximadamente a las 15 horas de iniciado el cultivo.

Al momento de la infección, se reemplazo el medio de cada pozo con medio COON'S F-12¹ suplementado y adicionado con polietilenglicol¹⁰ al 7%, tras lo cual se adicionaron 200 µl de los inóculos previamente preparados, utilizando 2 pozos/muestra. Las microplacas se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 6% de CO₂ durante 72 horas; después de este tiempo se les renovó el medio, incubándose otras 72 horas bajo las mismas condiciones, (Figura 2).

2.3 CONTROLES

En los dos últimos pozos de la parte superior de cada microplaca, se colocó una dilución 1:100 de *Chlamydia psittaci* cepa T 23 de afección en ovinos, donada por P.C. Griffiths del Laboratorio Central Veterinario de Weybrige, Inglaterra, como control positivo. La dilución de la cepa se realizó con SPG, y corresponde a 4×10^7 UFI/ml (UFI= unidades formadoras de inclusiones). Como control negativo fueron utilizados monoestratos

¹ Sigma Chemical Co. ST. Louis MO. 63178. USA.

² In Vitro, S.A. México.

⁶ NUNCLON DELTA, Inter Med, Nunc, Dinamarca.

⁷ DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

¹⁰ J.T. Baker U222-08. Xalostoc, México.

celulares no infectados, los cuales se mantuvieron en las mismas condiciones que los anteriores.

A fin de observar el efecto que otras bacterias mesófilas aerobias reportadas en este tipo de aves pudieran tener sobre las células, se utilizó otra microplaca con monoestratos celulares y con 60% de confluencia celular, donde se inocularon con 200 μ l de las siguientes bacterias: *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli* K 99, *Staphylococcus* β hemolítico y *Neisseria* sp., a 0.5 de MacFarland que corresponde a 5×10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro aproximadamente; en dilución 1:40, 1:80 y 1:120. Así mismo, se dejaron en este caso monoestratos celulares sin infectar; las infecciones se realizaron con la finalidad de que quedaran como controles negativos. La microplaca se incubó durante 3 horas a 37°C en atmósfera húmeda con 6% de CO₂ (Figura 3).

2.4 IDENTIFICACIÓN

La identificación de *Chlamydia psittaci* se llevó a cabo mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta, utilizando un suero policlonal contra *Chlamydia psittaci* preparado en conejos en el Departamento de Microbiología e Inmunología, de la Fac. Med. Vet. Zotec. UNAM., y conjugado comercial anti IgG de conejo marcado con isotiocianato de fluoresceína¹ (FITC). Una muestra se diagnostica positiva al observar las inclusiones citoplasmáticas características de la bacteria, y a aquellas identificadas como negativas en la primoinfección se les realizó un pase ciego. En caso de obtener un resultado negativo tras un segundo pase, la muestra fue considerada como negativa.

¹ Sigma Chemical Co. ST. Louis MO. 63178. USA.

TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

La técnica se realizó de la manera siguiente: se retiró el medio del cultivo celular y los cubreobjetos se fijaron con 1 ml de metanol absoluto³, durante 10 minutos, tras los cuales se dejaron secar perfectamente procediendo a la adición de 100 µl de suero de conejo (dilución 1/100), contra *Chlamydia psittaci*, incubándose por 15 minutos en una atmósfera húmeda a 37°C. Una vez realizada la incubación, los cubreobjetos se lavaron 2 veces con PBS estéril pH de 7.4 durante 2 minutos y a continuación se agregaron 100 µl de una dilución 1/100 del conjugado sobre cada cubreobjetos, (el conjugado se contrastó previamente con azul de Evans⁸, dilución 1/2000 (0.5 µl/ml). Los monoestratos con el conjugado se incubaron por espacio de 15 minutos en una atmósfera húmeda a 37°C en seguida, lavándose 2 veces más con PBI estéril pH de 7.4. Finalmente los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con 6 µl de resina (la superficie que tenía células quedó hacia abajo), y se revisaron en el microscopio de luz ultravioleta⁹ a una amplificación de 40 x.

IV.3 IDENTIFICACION DE MESÓFILOS AEROBIOS.

Las muestras contenidas en medio de Stuart³ se sembraron en medio agar Sangre³ y agar McConkey³ por medio de la técnica de aislamiento en cultivo puro y se incubaron a 37°C hasta 72 horas. Una vez que se observó crecimiento bacteriano, se hicieron frotis fijos a partir de una colonia aislada, los que se tñeron con Gram y se revisaron al microscopio óptico a una amplificación de 100 x.

Estas bacterias se identificaron por medio de pruebas bioquímicas de rutina según el manual de procedimientos Bergey's* (Diagrama de flujo No.2).

³ Merck Darmstadt, R. F. Alemania. Merck de México.

⁸ GIBCO. Limited PO BOX 35 Paisley, Scotland, U.K.

⁹ Micostar IV Leicaa, Inc. Buffalo, N. Y. USA.

* Murray R: G. : Bergey's Manual of Systematic Editorial Board Williams & Wilkins, Baltimore, USA.

V. RESULTADOS

V.1 IDENTIFICACIÓN DE *Chlamydia psittaci*

La detección del microorganismo a través de la técnica de inmunofluorescencia, se observa en inclusiones intracitoplasmáticas de un color amarillo y los fibroblastos en color rojo. Los 2 grupos de aves muestreados en cautiverio y semicautiverio, correspondió a un 100% de inmunofluorescencia, tanto para las muestras cloacales como para las conjuntivales (figura No. 4).

De este modo, se observó que los efectos del antígeno en los monoestratos celulares mostraban importantes diferencias entre ellos, como por ejemplo:

Cambios en la morfología de la célula huésped. En los monoestratos que se infectaron con muestras cloacales, se observó mayor destrucción celular, una mayor cantidad de células redondas y una menor cantidad de inclusiones en cada célula, en relación a los monoestratos que fueron infectados con muestras conjuntivales, en estos la destrucción celular fue menor, hubo un mayor número de fibroblastos alargados aunque las inclusiones clamidiales eran más pequeñas, pero con mayor número de inclusiones clamidiales/muestra.

Diferencias en la variación en el grado de infección. Considerando solamente la presencia de inclusiones clamidiales, el grado de infección por *Chlamydia psittaci* en los fibroblastos, se observó dentro de un rango del 20 al 90% para ambos tipos de muestras analizadas. Sin embargo, considerando cada tipo en particular, se encontró que en los monoestratos celulares infectados con inóculos cloacales esta variación no fue significativa, mientras que en aquellos infectados a partir de inóculos conjuntivales arriba del 50% de los cultivos/muestra, presentaron cerca del 90 % de infección (Figuras 5 y 6).

Así mismo, es importante mencionar que se observaron cuerpos elementales que rodeaban a la célula, aproximadamente en un 30 % de las muestras conjuntivales y en un 10 % de las muestras cloacales.

La morfología de inclusiones clamidiales. En las muestras cloacales las inclusiones citoplasmáticas se observaron de mayor tamaño en comparación con las muestras conjuntivales, pero con un número mayor de bacterias en estas últimas.

Otro punto de interés, fue la observación de "inclusiones abortadas" que se encontraban fuera de la célula infectada sin que ésta se haya lisado. Este fenómeno se detectó en un 15% de las muestras cloacales y 7.5% en las muestras conjuntivales, pero únicamente sucedió en los monoestratos que tenían una infección con inclusiones clamidiales mayor al 80 %.

Por otro lado, en los monoestratos inoculados con las bacterias mesófilas que se utilizaron como controles para comprobar que no hubiera ninguna reacción positiva no se observó ningún cambio en las células de estos, tan poco presentó nada que pudiera parecerse a una inclusión similar a las que forma *Chlamydia psittaci*.

V. 2 BACTERIOLÓGICOS DE MESÓFILOS AEROBIOS

Los aislamientos de bacterias mesófilas aerobias obtenidos trabajo de cloaca y conjuntiva de las aves en cautiverio y semicautiverio muestreadas son los siguientes:

A) Del primer grupo, 20 aves en cautiverio, se aislaron de las muestras cloacales *Corynebacterium pseudotuberculosis* (2/20) en *A. ochrocephala*, *C. xerosis* (3/20) en *Amazonas autumnalis*, *A. Albifrons* y *A. festiva*; *Erysipelothrix rhusiopathiae* (4/20) en *A. ochrocephala*, *Agapornis* sp., *Aratinga* sp., y *Melopsittacus* sp; *Flavobacterium spiritorum* (1/20) de *Aratinga* sp.; *Klebsiella* sp. (5/20) de *Melopsittacus* sp; *Kurthia* sp.

(1/20) en *Aratinga* sp; *Staphylococcus aureus* (3/20) en *A. aestiva*, *A. albifrons*, *A. festiva* y *Staphylococcus saprophyticus* (2/20) en *Amazonas autumnalis*.

De las muestras que correspondieron a conjuntiva se aislaron *Klebsiella* sp. 1/20 en *Amazonas autumnalis*; *Neisseria* sp. (4/20) en *Melopsittacus* sp., y *Staphylococcus* sp (1/20) de *Melopsittacus* sp.

B) En el segundo grupo 20, aves en semicautiverio, los géneros que se identificaron de muestras de cloaca fueron: *Corynebacterium haemolyticum* (1/20) en *A. farinosa*; *C. murium* (1/20) de *Ara ararauna*; *C. pseudotuberculosis* (1/20) en *Rhamphastos sulphuratus*; *Actynomices pyogenes* (1/20) en *A. aestiva*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* (2/20) en *A. farinosa* y *A. macao*; *Escherichia coli* (2/20) en *Ara ararauna*; *Klebsiella* sp. (1/20) en *A. macao* y *Staphylococcus saprophyticus* (2/20) *A. farinosa*.

Para las muestras conjuntivales los géneros correspondientes fueron: *Corynebacterium murium* (1/20) de *A. macao*; *Klebsiella* sp. (1/20) en *A. farinosa*; *Neisseria* sp. (2/20) en *A. aestiva* y *Rhamphastos sulphuratus*; y *Staphylococcus* sp., (1/20) en *Ara ararauna*.

(Cuadros 1 y 2).

VI DISCUSIÓN.

La clamidiosis en las aves se ha diagnosticado en todo el mundo, principalmente se ha demostrado la presencia del microorganismo en aves muertas que padecieron la enfermedad, en heces, o hisopo cloacal y con la detección de anticuerpos anti-clamidia.

Los resultados que se obtuvieron en esta investigación coinciden con la informes de clamidiosis en forma inaparente en los psitácidos mediante la técnica de inmunofluorescencia que van hasta un 100 % (3,30,3237), poniendo de manifiesto la

presencia de la bacteria *Chlamydia psittaci*; aves clínicamente sanas que por tanto pueden sugerirse como portadores asintomáticos de la enfermedad (23,36).

Probablemente la temperatura juegue un papel importante en la adaptación de las cepas aviares de loros (VS1) (80026), de pavos (TT3), de pericos (6BC), y de cacatúas (80033) entre otras. Se ha mencionado que la capacidad de adherencia de la bacteria mediada por receptores varía de acuerdo a la temperatura, y en este caso, tal vez la temperatura de las aves (41°C) favorezca la adhesión (30). También se conoce que la temperatura óptima de multiplicación para la bacteria debe ser menor a 37°C sin disminuir los 35°C; algunos autores mencionan que tal vez esta característica justifique el tropismo hacia la conjuntiva en las aves y el tracto respiratorio donde la temperatura es menor a los 37°C (30). De tal forma se podría pensar que la temperatura del tracto gastrointestinal limita la multiplicación de las bacterias y esto sea lo que induce a las infecciones subclínicas en las aves.

La variación en el porcentaje de infección de los monoestratos infectados con muestras cloacales (entre 20 y 90 %) y conjuntivales (en su mayoría cerca del 90 %), se puede atribuir a las siguientes causas: la capacidad del microorganismo para infectar la célula epitelial, debido a las variaciones de virulencia que existen entre las cepas de *Chlamydia psittaci*, las diferencias entre las especies de aves, las diferencias que existen entre los factores de relación parásito-huésped, la capacidad del antígeno para adaptarse al cultivo celular y la cantidad del antígeno de cada muestra (6). La cantidad del antígeno puede variar en cada muestra ya que la eliminación del microorganismo es de forma intermitente, en relación a las condiciones del hábitat de cada ave, y a la tensión a la que es sometida diariamente; (esto disminuye la cantidad de antígeno que se elimina) (3,5,6)

Por otra parte, la presencia de puntilleo que se observó y que corresponde a cuerpos elementales fuera de la célula se puede explicar por las diferencias de virulencia entre las cepas de *C. psittaci*, ya que tal vez, algunas de estas cepas requieran de un mayor tiempo para infectar a las células del cultivo celular y esto puede sugerir una capacidad de cepa para adaptarse al cultivo *in vitro*. Esto se observó más en muestras tomadas de cloaca y en algunas muestras de conjuntiva por lo que se puede atribuir a que sean menos virulentas que las muestras de conjuntiva. Se sabe por ejemplo que el ciclo de desarrollo de las cepas clamidiales entéricas y de aborto de afección en ovinos es de 30 y 70.5 horas respectivamente, debido probablemente a la competencia que existe con otros microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal y reproductivo (8,14), y que los tiempos en que las cepas de afección en pavos llevan a cabo su ciclo de desarrollo varían igualmente; de tal forma que las cepas altamente patógenas se multiplican más rápido que las cepas de baja patogenicidad (38). A pesar de esto, en la actualidad, los mecanismos por los cuales las aves alojan al bacteria no se conocen claramente (39).

La gran mayoría de los informes que existen en otros países reportan a casos positivos a *Chlamydiae* en aves muertas ó en aves infectadas experimentalmente (6,24,26,36,41).

La substancia inmunodeterminante del antígeno de grupo del género *Chlamydia* es un lipopolisacárido ácido con residuos de Kdo, que también se encuentra presente en algunas bacterias Gram negativas como *Salmonella* del quimiotipo rugoso y algunos serovares de *Acinetobacter calcoaceticus* (27,28). Así mismo, se ha demostrado que en algunas pruebas serológicas para *Chlamydia* pueden encontrarse reacciones falsas positivas en un rango del 1 al 2 % debido a algunos casos a contaminaciones bacterianas (7). De acuerdo a lo que se observó al infectar las células L-929 con las otras bacterias mesófilas aerobias, demuestra que el porcentaje de aislamiento de *Chlamydia psittaci*

determinado en este trabajo en las aves muestreadas no es consecuencia de reacciones cruzadas positivas con estas bacterias (41).

En este estudio, se realizó a partir de aves infectadas naturalmente; sin embargo, las técnicas de aislamiento en cultivo celular acompañado de inmunofluorescencia demostraron ser un buen procedimiento para el aislamiento y la identificación del microorganismo. El diagnóstico de infecciones subclínicas (23,45), demuestra que puede seguir utilizándose y ampliarse para quien la requiera como técnica de diagnóstico en el país. La prueba de inmunofluorescencia indirecta tiene una sensibilidad: 88.9%, especificidad: 96.3%, eficacia: 93.0% y un límite de confianza: 99.5% (4,32,37). Por otro lado, las bacterias que se aislaron junto con *Chlamydia psittaci*, pueden contribuir indirectamente a la manifestación de la clamidiosis en algún momento, dado que estas especies pueden comportarse como patógenos oportunistas, algunos de ellos pueden afectar la misma región anatómica que afectan las clamidias.

Debido a que las aves se encuentran clínicamente sanas podemos pensar que estas bacterias forman parte de la flora de cloaca o conjuntiva, por lo que no se les puede relacionar con la presencia de *Chlamydia* en las aves muestreadas (3).

Finalmente sería importante ampliar este estudio al identificar el tipo de cepas aviares que existen en nuestro país, buscar nuevas alternativas para proporcionar mayor información en nuestro medio, evitar el contrabando, dar a conocer a los dueños de aves el riesgo de un posible contagio si no se conoce el estado real de salud del ave, y buscar de ser necesario el control gubernamental.

LITERATURA CITADA

1. Andersen, A. A.: Comparison of avian *Chlamydia psittaci* isolates by restriction endonuclease analysis and serovar specific monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 244-249. (1991).
2. Andersen, A. A. and Tappe, P. J.: Genetic, immunologic, and pathologic characterization of avian chlamydial strains. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1512-1516. (1989).
3. Andre, J. P.: La chlamydiose aviaire à *Chlamydia psittaci* chez les oiseaux de cage: revue bibliographique. *Revue Méd. Vét.*, 145: 915-929.
4. Brand, J. C.: Chlamydial infection in free-living birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 531-534. (1989).
5. Brown, A. P. and Newan A. J.: Methods of chlamydial antigen detection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1567- 1570. (1989).
6. Buuren van, E. C., Dorrestein, M. G. and Dijk van, E. J.: *Chlamydia psittaci* infections in birds: a review on the pathogenesis and histopathological features. *Vet. Quarterly.*, 16: 38-41. (1991).
7. Crowther, J.: ELISA manual, Edited by: *The International Atomic Energy Agency*. Viena, Austria. (1989).
8. Escalante, O. C.: Comparative serological investigation of a sheep flock from Mexico for evidence of *Chlamydia psittaci* infection. Tesis de maestría *University of Surrey*, United Kingdom, (1991).
9. Flammer, K.: Treatment of chlamydiosis in exotic birds in the United states *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1537- 1540. (1989).
10. Fukushi, H. and Hirai, K.: Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42: 306-308. (1992).

11. Garbe, L. J. A.: Legal aspects of chlamydiosis in birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1574-1576. (1989).
12. Gerbermann, H.: Current situation and alternatives for diagnosis and control of chlamydiosis in the Federal Republic of Germany. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1542-1547. (1989).
13. Graham, L. D.: Histopathologic lesions associated with chlamydiosis in psittacine birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1571-1573. (1989).
14. Griffiths, P. C., Philips, H. C., Dawson, M. and Clarkson, M. J.: Antigenic and morphological differentiation of placental and intestinal isolates of *Chlamydia psittaci* of ovine origin. *Vet. Microbiol.*, 30: 165-167. (1989).
15. Grimes, E. J.: Interpretation of the chlamydial titers infections. *J. Assoc. Avian Vet.*, 7: 159-160. (1993).
16. Grimes, E. J.: Serodiagnosis of avian *Chlamydia* infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1561-1563. (1989).
17. Harris, M. D.: Avian companions and the human-animal bond. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1517-1518. (1989).
18. Harrison, J. G.: A practitioner's view of the problem of avian chlamydiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1525-1528. (1989).
19. Hinton, G. D., Shipley, A., Galvin, W. and Brunton, A. R.: Chlamydiosis in workers at duck farm and processing plant. *Aus. Vet. J.*, 70: 174-176. (1993).
20. Johnson, M. C. and Grimes, J. E.: Reistance of wild birds to infection by *Chlamydia psittaci* of mammalian origin. *J. Infect Dis.*, 147: 162. (1983).
21. Ley, H. D., Flammer, K., Cowen, P. and Whitt, D.: Performance characteristics of diagnostic test for avian chlamydiosis. *J. Assoc. Avian Vet.*, 7: 203-207. (1993).

22. Mallison, T. E.: potential of a voluntary caged pet bird improvement program. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1535-1536. (1989).
23. Meteyer, U. C., Chin, P. R., Castro, E. A., Woods, W. L. and Gentzeler, P. R.: An epizootic of chlamydiosis high mortality in captive population of euphonias (*Euphonia violaceas*) and himminbirds (*Amazilia amazillas*). *Journal of Zoo and Wild. Med.*, 23: 22-229. (1992).
24. Moore, M. F. and Petrak, L. M.: *Chlamydia* immunoreactivity in birds with psittacosis: localization of *chlamydiae* by the peroxidase-antiperoxidase method. *Avian Dis.*, 24: 1036-1042. (1985).
25. Newman, A. J.: *Chlamydia* spp infection in turkey flocks in Minnesota. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1528-1530. (1989).
26. Pearson, E. J.: Isolation and identification of *Chlamydia psittaci* from pet birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1564-1566. (1989).
27. Pepin, M., Bailly, L., Sourlav, A. and Rodolakis, A.: An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of chlamydial antibodies in caprine sera. *Ann. Rech. Vet.*, 16: 393-398 (1985).
28. Pérez-Martínez, J.A., Schmeer, J. and Storz, J.: Bovine clamydial abortion: serodiagnosis by modified complement fixation T indirect inclusion fluorescence tests and enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.*, 47: 1501-1506 (1986).
29. Ritchie, H. W.: The USA requirements for control of clamydiosis in imported birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1541-1542. (1989)
30. Rodolakis, A.: Les infections à *Chlamydia psittaci*: acquisitions récentes et applications au diagnostic et à l'épidémiologie des chlamydioses aviaires, canines et félines. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 28: 321-330. (1993).

31. Salinas J., Caro, R. M. and Cuello F.: Antibody prevalence and isolation of *Chlamydia psittaci* from pigeons (*Columbia livia*). *Avian Dis.*, 37: 523-527. (1993).
32. Salinas J., Caro, R. M. and Cuello F.: Comparison of different serological methods for the determination of antibodies to *Chlamydia psittaci* in pigeon sera. *Vet. Med. B.*, 40: 239-244. (1989).
33. Schachter, J.: Chlamydial infections-past, present, future. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1501-1506. (1989).
34. Schnorr, L. K.: Chlamydial vaccines. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1548-1560. (1989).
35. Suwa, T. and Itakura, C.: Ultrastructural studies of chlamydia-infected air sacs of chicks. *Avian Pathol.*, 21: 443-452. (1992).
36. Tappe, J. P., Andersen, A. A. and Cheville N. F.: Respiratory and pericardial lesions in turkeys infected with avian or mammalian strains of *Chlamydia psittaci*. *Vet. Pathol.* 26: 386-395. (1989).
37. Trap, D., Mahe, D. A. et Vandeveld, J.: Dépistage de *Chlamydia psittaci* chez les oiseaux. Comparaison du test clear view *Chlamydia*, de l'immunofluorescence de l'inoculation aux oeufs embryonnés. *Revue. Méd. Vét.*, 145: 261-266. (1994).
38. Varompay, D., Charlier, A., Ducatelle, R. and Haesebrouck, F.: Ultrastructural changes in avian *Chlamydia psittaci* serovar A, B and D on infected buffalo green monkey Cells. *Inf. Imm.*, 1996 (In press).
39. Varompay, D., Ducatelle, R. and Haesebrouck, F.: *Chlamydia psittaci* infections: review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet. Microbiol.*, 45: 93-119. (1995).
40. Varompay, D., Ducatelle, R. and Haesebrouck, F.: Diagnosis of avian chlamydiosis: specificity of the modified Gimenez staining on smears and comparison of the

- sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures *J. Vet Med. B*, 39: 105-112. (1992).
41. Varompay, D., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. and Hendrickx, W.: Primary pathogenicity of an european isolate of *Chlamydia psittaci* from turkey poult. *Vet. Microbiol.*, 38: 103-113. (1993).
42. Williams, C. J. and Vodkin, H. M.: Metabolism and genetics of chlamydias and rickettsias. *J. Vet. Res.*, 54: 211-221. (1987).
43. Williams Jr., P. L.: Review of the epidemiology of chlamydiosis in the Unit States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1518-1521. (1989).
44. Wyrick, B. P. and Richmond, J. S.: Biology of *Chlamydiae*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195: 1507-1512. (1989).
45. Zuba, R. J., Janssen, L. D., Loomis, L. M. and Shima, L. A.: Management of Chlamydiosis in quarantined exotic columbiformes. *J. Zoo. Wild Med.*, 23: 86-91. (1992).

FIGURA No. 1. CICLO DE DESARROLLO DE LAS CHLAMYDIAS.

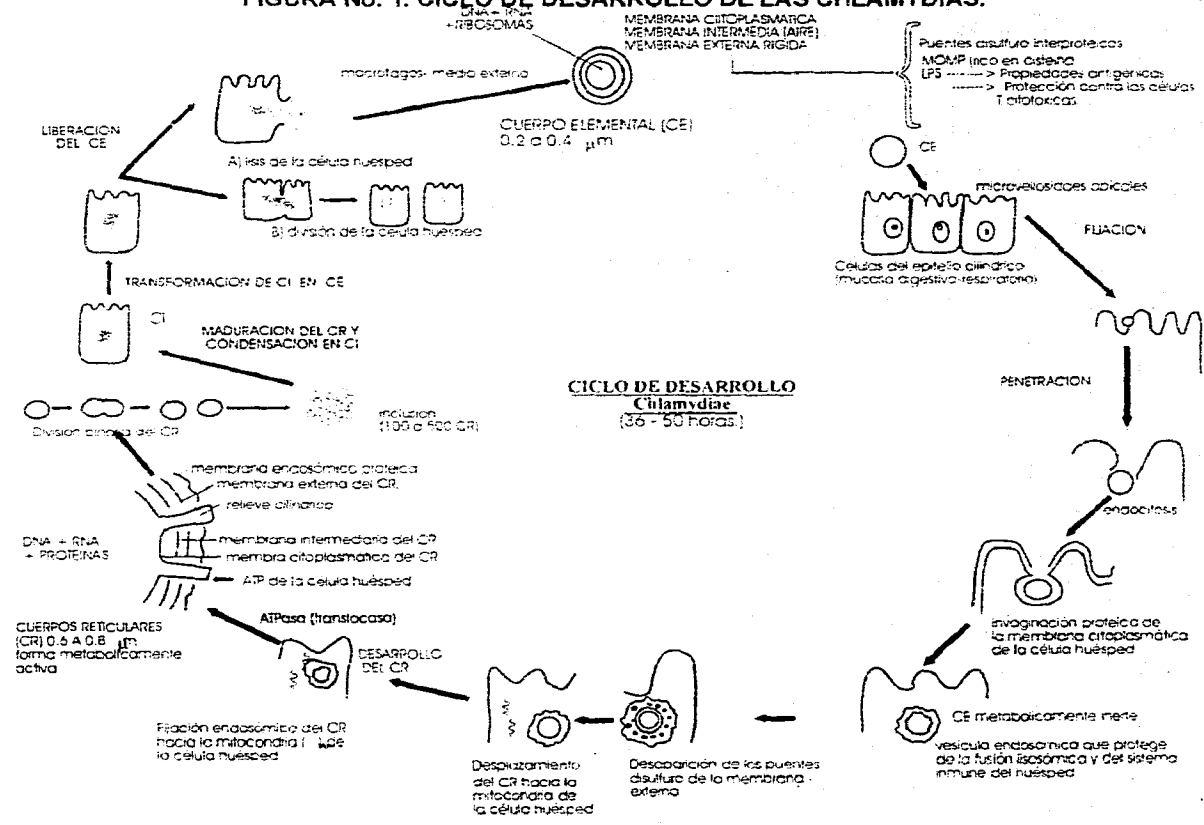


DIAGRAMA DE FLUJO No. 1. PROCESAMIENTO DEL ANTIGENO PARA LA IDENTIFICACION DE *Chlamydia psittaci*.

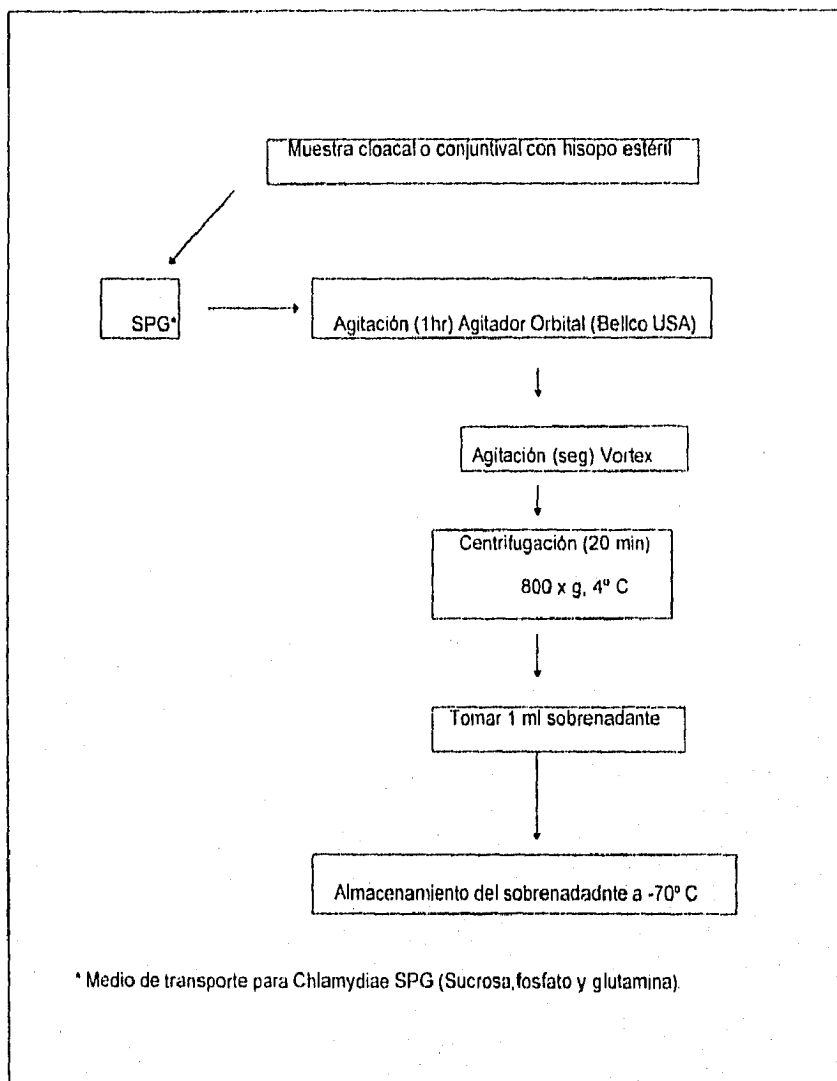


FIGURA No.2. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CULTIVO CELULAR (L- 929) EN MONOESTRATOS Y CONTROLES.

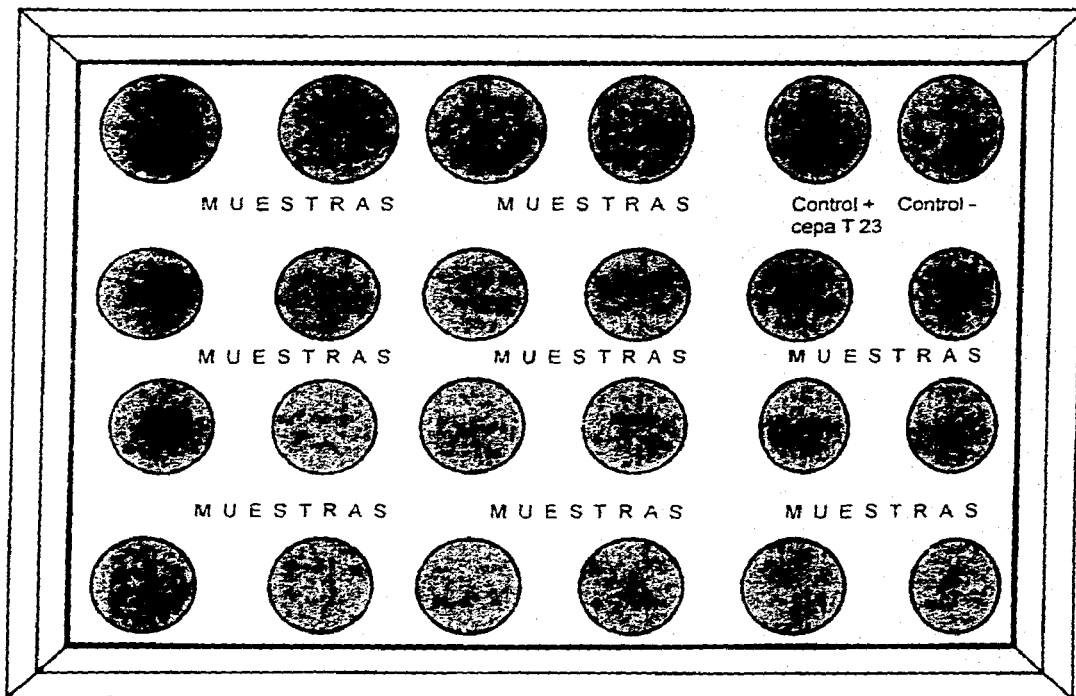


FIGURA No. 3. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CULTIVO CELULAR (U- 929) EN MONOESTRATOS Y CONTROLES POSITIVOS.

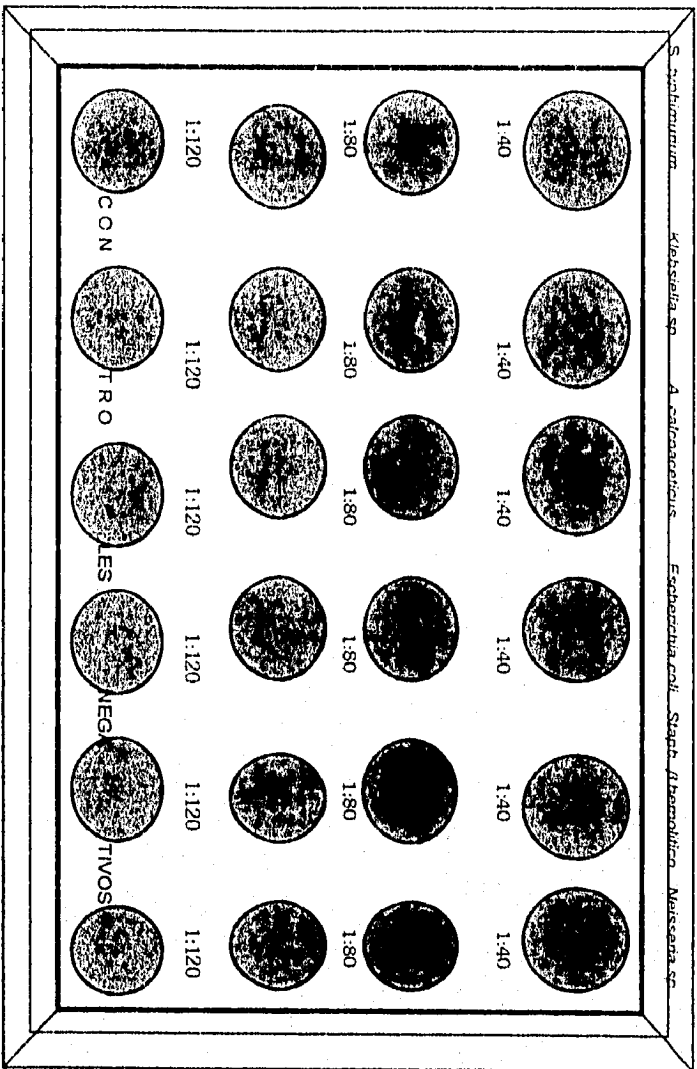


DIAGRAMA DE FLUJO No. 2. PROCESO DE LAS MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO DE MESOFILOS AEROBIOS.

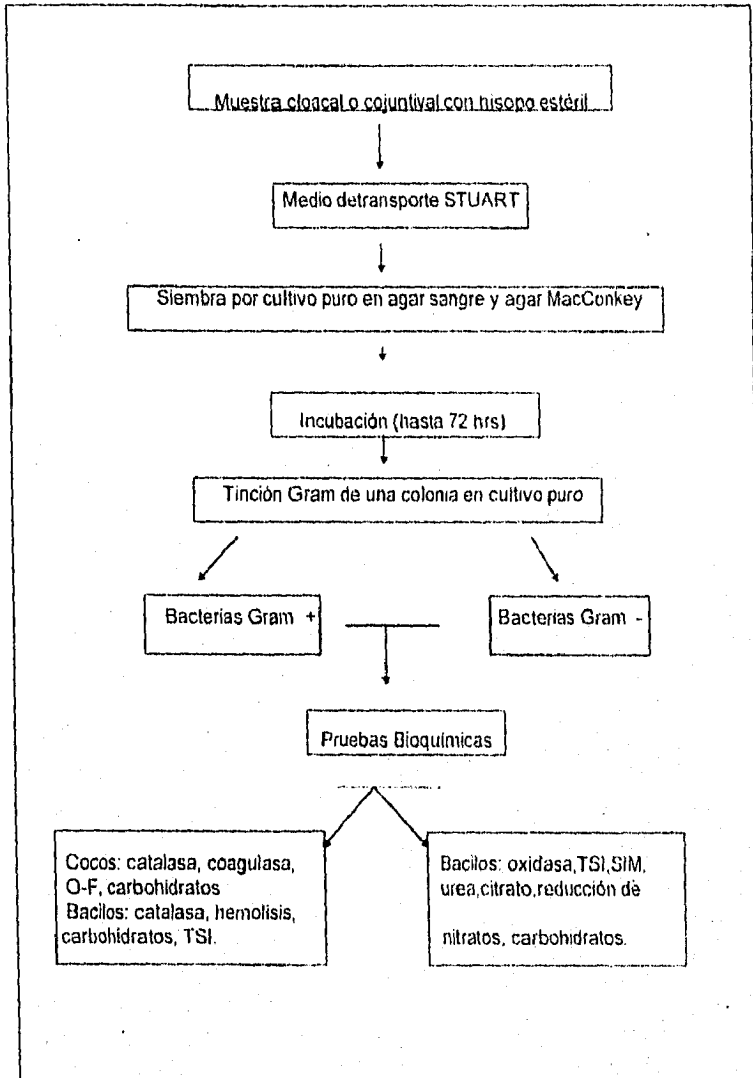
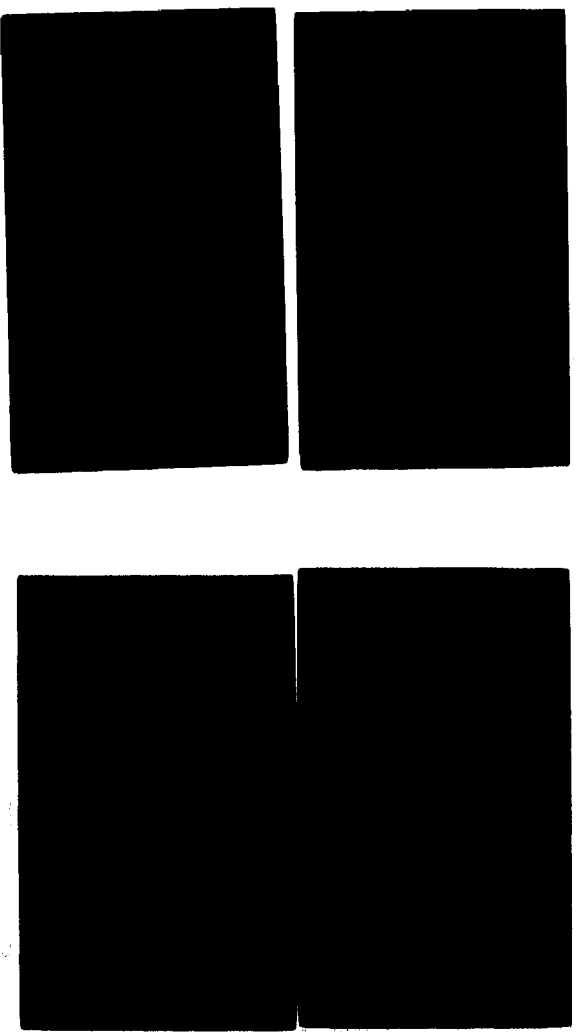


FIGURA No. 4. IDENTIFICACION DE *Citramydia psittaci* POR MEDIO DE LA TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.



- 1. Celdas de color rojo.
 - 2. Inclusiones de color amarillo fluorescente.
- Amplificación 40 x.

FIGURA No.5. GRADO DE INFECCION POR *C. psittaci* EN CULTIVO CELULAR (L-929) A PARTIR DE MUESTRAS CLOACALES EN AVES DE ORNATO.

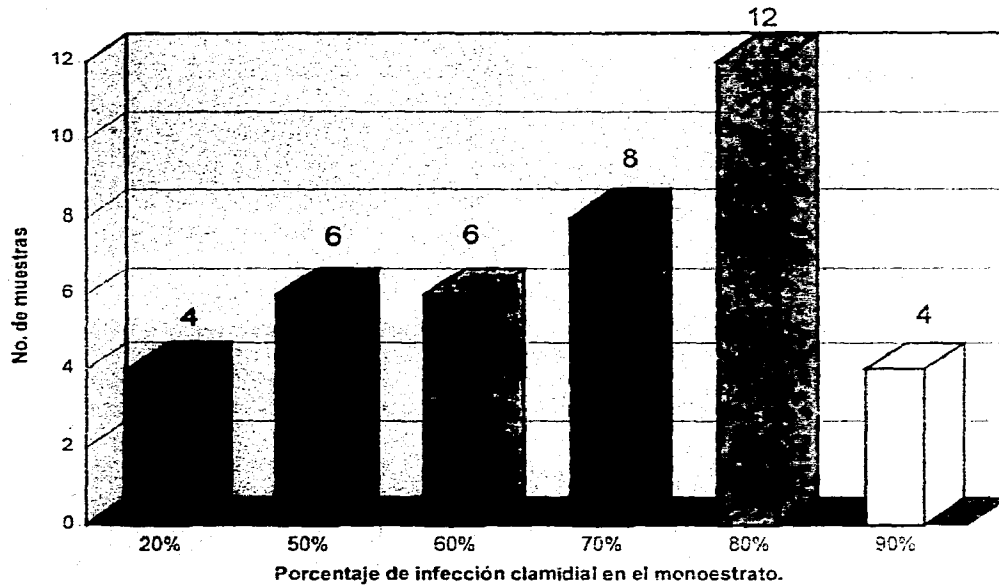
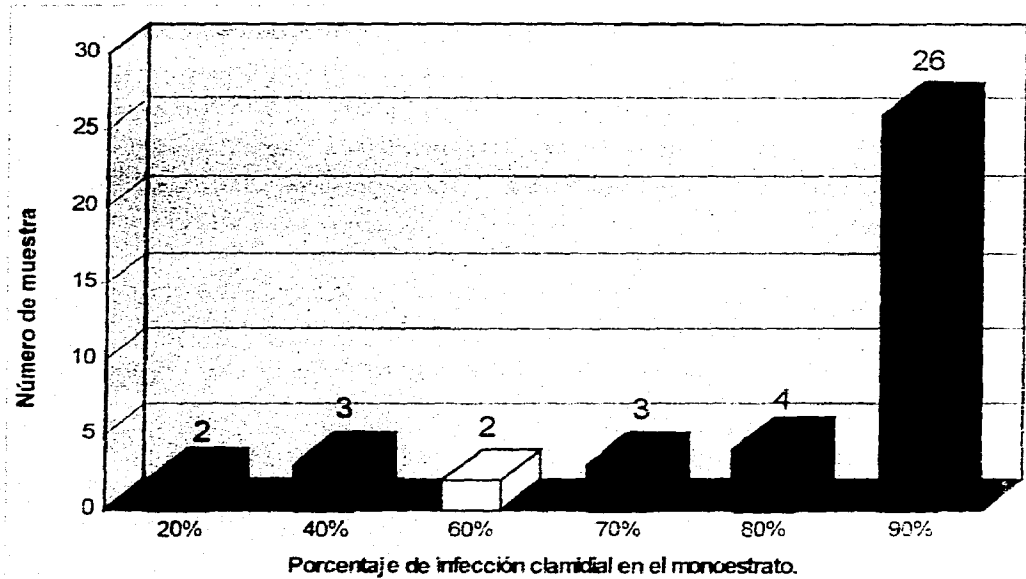


FIGURA No. 6. GRADO DE INFECCION DE *C. psittaci* EN CULTIVO CELULAR(L-929) A PARTIR DE MUESTRAS CONJUNTIVALES DE AVES DE ORNATO



CUADRO No. 1 BACTERIAS MESOFILAS AEROBIAS AISLADAS A PARTIR DE AVES EN CAUTIVERIO (GRUPO 1).

TIPO DE MUESTRA	MICROORGANISMO AISLADO		
	GENERO	REACCION AL GRAM	No AVES
HISOPO CLOCAL n = 20	BACILOS		
	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	POSITIVO	2/20
	<i>Corynebacterium xerosis</i>	POSITIVO	3/20
	<i>Erysipelotrix rhusiopathiae</i>	POSITIVO	4/20
	<i>Flavobacterium spiritivorum</i>	POSITIVO	1/20
	<i>Klebsiella sp.</i>	NEGATIVO	5/20
	<i>Kurthia sp.</i>	POSITIVO	1/20
	COCOS		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	POSITIVO	3/20
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	POSITIVO	2/20
HISOPO CONJUNTIVAL n = 20	BACILOS		
	<i>Klebsiella sp.</i>	NEGATIVO	1/20
	COCOS		
	<i>Neisseria sp.</i>	NEGATIVO	4/20
<i>Staphylococcus sp.</i>	POSITIVO	1/20	

CUADRO No. 2. BACTERIAS MESOFILAS AEROBIAS AISLADAS DE AVES EN SEMICAUTIVERIO (GRUPO 2).

TIPO DE MUESTRA	MICROORGANISMO AISLADO		
HISOPO CLOACAL n = 20	GENERO	REACCION AL GRAM	No AVES
	<p>BACILOS</p> <p><i>Corynebacterium haemolyticum</i></p> <p><i>Corynebacterium munitum</i></p> <p><i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i></p> <p><i>Actinomyces pyogenes</i></p> <p><i>Erysipelotrix rhusiopathiae</i></p> <p><i>Escherchia coli</i></p> <p><i>Klebsiella sp.</i></p> <p>COCOS</p> <p><i>Staphylococcus saprophyticus</i></p>	<p>POSITIVO</p> <p>POSITIVO</p> <p>POSITIVO</p> <p>POSITIVO</p> <p>POSITIVO</p> <p>NEGATIVO</p> <p>NEGATIVO</p> <p>POSITIVO</p>	<p>1/20</p> <p>1/20</p> <p>1/20</p> <p>1/20</p> <p>2/20</p> <p>2/20</p> <p>1/20</p> <p>2/20</p>
HISOPO CONJUNTIVAL n = 20	<p>BACILOS</p> <p><i>Corynebacterium murium</i></p> <p><i>Klebsiella sp.</i></p> <p>COCOS</p> <p><i>Neisseria sp.</i></p> <p><i>Staphylococcus sp.</i></p>	<p>POSITIVO</p> <p>NEGATIVO</p> <p>NEGATIVO</p> <p>POSITIVO</p>	<p>1/20</p> <p>1/20</p> <p>2/20</p> <p>1/20</p>